

Artigo de Revisão Bibliográfica

O papel central do glucagon na fisiopatologia da diabetes mellitus e as suas potenciais implicações no desenvolvimento de novas terapêuticas

Rodrigo Pinto Costa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM **MEDICINA**

Orientador: Dr. Jorge Manuel das Dores

Porto, 2016

Título da dissertação

O papel central do glucagon na fisiopatologia da diabetes mellitus e as suas potenciais implicações no desenvolvimento de novas terapêuticas – artigo de revisão

Autor

Rodrigo Pinto Costa

Orientador

Dr. Jorge Manuel das Dores

Assistente Hospitalar Graduado de Endocrinologia do Centro Hospitalar do Porto

Professor Auxiliar Convidado das Unidades Curriculares de Terapêutica Geral I e II, do Mestrado Integrado em Medicina no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Afiliação

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Rua de Jorge Viterbo nº 228

4050-313 Porto, Portugal

RESUMO

Introdução e objetivos: A DM é uma doença altamente prevalente que acarreta grande morbimortalidade a nível mundial. Torna-se assim fundamental prevenir as suas complicações através de um controlo glicémico adequado. Contudo, por se tratar de uma doença complexa, a sua fisiopatologia ainda não está completamente esclarecida e o tratamento da mesma carece, seguramente, de profunda melhoria. Neste sentido, a revisão que se segue pretende explorar novos caminhos no tratamento da DM, nomeadamente, o papel do glucagon na fisiopatologia da doença e qual o potencial terapêutico da modulação da sua secreção e ação.

Materiais e métodos: Foi efetuada uma revisão bibliográfica, recorrendo à análise de publicações científicas presentes na base de dados PubMed no período de 1970 a 2016.

Resultados: O glucagon é uma hormona hiperglicemiante produzida, principalmente, nas células alfa do pâncreas, tendo como principal função a produção hepática de glicose. Em doentes com DM verifica-se uma disfunção do glucagon, com hiperglucagonemia, que contribui para a labilidade glicémica característica destes doentes. Muitos dos fármacos utilizados atualmente para o tratamento da DM têm efeitos na secreção e ação do glucagon, diminuindo-as, o que pode ser responsável por parte do seu efeito antidiabético. No entanto, o desenvolvimento da pesquisa nesta área tem apontado para a importância de fármacos moduladores do glucagon, por exemplo os antagonistas dos recetores do glucagon ou anticorpos monoclonais anti-glucagon, com demonstração de resultados promissores.

Conclusões: O glucagon assume um papel importante na hiperglicemia nos doentes com DM, pelo que a utilização de fármacos dirigidos primariamente à inativação ou bloqueio do recetor do glucagon ou à inibição da sua síntese e secreção, pode contribuir para se atingir um melhor controlo glicémico.

Palavras-chave: Diabetes mellitus, glucagon, recetor do glucagon, hiperglucagonemia, célula alfa, tratamento.

ABSTRACT

Introduction and objectives: DM is a highly prevalent disease responsible for great morbidity and mortality worldwide. Thus, preventing its complications through an adequate glycemic control is crucial. However, due to its complexity, its pathophysiology is not completely understood and its treatment has yet to improve. The current review explores new pathways for the treatment of DM focusing on the role of glucagon in the pathophysiology of the disease and the therapeutic target on modulating its secretion and action.

Methods: A literature review was conducted, utilizing scientific publications in PubMed database including the years 1970-2016.

Results and discussion: Glucagon is a hyperglycemic hormone mainly produced in the pancreatic alpha cells, with a powerful stimulatory effect on hepatic glucose production. A glucagon dysfunction is observed in diabetic patients, which contributes to glycemic volatility, a hallmark of these patients. Many of the drugs currently used to treat diabetes exert some of their antidiabetic effect by inhibiting glucagon secretion or its action. Nonetheless, the promising results of the research on this topic highlight the importance of the development of glucagon-specific targeted therapies, such as glucagon receptor antagonists or monoclonal antibodies.

Conclusions: Glucagon plays an important role to the hyperglycemia of diabetic patients. Therefore, the use of antidiabetic drugs specifically directed to the inactivation or blockage of glucagon receptor or restraining glucagon secretion or action might improve glycemic control in diabetic patients.

Keywords: Diabetes mellitus, glucagon, glucagon receptor, hiperglucagonemia, alpha cell, treatment.

AGRADECIMENTOS

Deixo o meu agradecimento ao Senhor Dr. Jorge Dores, pela sua orientação científica, disponibilidade e revisão de conteúdos.

Estendo a minha gratidão à minha família e amigos que estiveram sempre presentes ao longo deste percurso.

ÍNDICE

Resumo	IV
Abstract.....	V
Agradecimentos	VI
Índice	VII
Lista de abreviaturas	VIII
Introdução e objetivos	1
Material e métodos	3
Resultados e discussão	4
Fisiologia do glucagon	4
Hiperglucagonemia na diabetes mellitus.....	7
Aplicação clínica	10
Antidiabéticos comercializados com efeito no glucagon	10
Insulina	10
Metformina.....	11
Sulfonilureias	11
Inibidores do co-transportador de sódio e glicose tipo 2 (SGLT-2)	12
Agonistas do péptido semelhante ao glucagon-1 (GLP-1).....	12
Inibidores da dipeptidil dipeptidase-4 (DPP-4)	13
Fármacos moduladores do glucagon em investigação	15
Inibidores da síntese do recetor do glucagon - oligonucleótidos antisense	15
Inibidores da secreção do glucagon	16
Anticorpos monoclonais.....	17
Antagonistas dos recetores do glucagon	17
Conclusões	20
Referências bibliográficas.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS

Arx - aristaless-related homeobox
ATP – adenosina trifosfato
cAMP – adenosina monofosfato cíclica
DM – diabetes mellitus
DPP-4 – dipeptidil peptidase 4
GABA – ácido gama-aminobutírico
GI – gastrointestinal
GIP – péptido insulínico dependente de glucose
GLP-1 – péptido semelhante ao glucagon 1
GLP-2 - péptido semelhante ao glucagon 2
Gcgr-ASO – glucagon receptor antisense oligonucleotides
HbA1c – hemoglobina glicada
LDL – lipoproteína de baixa densidade
NCD - noncommunicable disease
PKA – proteína cinase A
SGLT-2 - co-transportador de sódio e glicose tipo 2

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A DM é uma doença crónica e progressiva, cuja característica fenotípica consiste em níveis elevados da glicemia. A sua patogénese implica uma produção insuficiente de insulina pelo pâncreas, uma ação ineficaz desta ou uma sobreposição destes dois mecanismos. A hiperglicemia, uma anomalia no metabolismo dos hidratos de carbono, é apenas uma das características dentro de uma panóplia de outros distúrbios metabólicos característicos desta doença, tais como, o distúrbio no metabolismo dos lípidos e das proteínas. A DM é uma causa importante de cegueira, falência renal, amputação não traumática dos membros inferiores e outras complicações, nomeadamente, cardiovasculares, constituindo uma importante fonte de redução da qualidade e da esperança de vida (1). Dada a existência destas complicações, macro e microvasculares, bastante prevalentes na população diabética, deve-se encarar a DM como uma doença vascular e procurar ativamente os fatores de risco associados.

A DM é um problema de saúde pública a nível mundial, sendo uma das quatro principais NCDs (doenças não comunicáveis), de acordo com a OMS. Nas últimas três décadas, quer a incidência, quer a prevalência desta doença têm vindo a aumentar (1).

Estima-se que, em 2014, mais de 422 milhões de pessoas, a nível mundial, seriam diabéticas. Em 1980, esse mesmo número, era de 108 milhões. Atualmente, a prevalência mundial, ajustada à idade, é de cerca de 8,5% da população adulta, sendo que em 1980 era de 4,7%. Todos estes números citados refletem um aumento da prevalência dos fatores de risco associados à DM, nomeadamente, o excesso de peso (1).

A mortalidade mundial associada à DM, em 2012, foi de 1,5 milhões de mortes, sendo que, nesse ano, foi a oitava causa de morte em ambos os sexos, mas quinta nas mulheres. O número de mortes relacionadas com outras doenças associadas a hiperglicemia foi de 2,2 milhões. Desta forma, estamos perante uma mortalidade mundial de 3,7 milhões, em que 43% eram indivíduos com menos de 70 anos (1).

Para além do referido, os custos associados a esta doença, quer para o doente e suas famílias, como para a própria sociedade, são também muito elevados. Torna-se assim fundamental a prevenção das complicações associadas à DM através do atingimento de um bom controlo glicémico. Todavia, esta doença é dotada de grande complexidade e, inclusivamente, a própria fisiopatologia da mesma ainda não está completamente esclarecida, pelo que, atualmente, é difícil atingir e manter os objetivos

glicêmicos. Desta forma, há a necessidade de encontrar novos fármacos que atuem em conformidade com a fisiopatologia da doença.

Neste sentido, a revisão que se segue pretende explorar outros caminhos no tratamento da DM que, classicamente, se centra na insulina, particularmente o papel do glucagon na fisiopatologia da doença e qual o potencial terapêutico da modulação da secreção e ação desta hormona.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi efetuada uma revisão do estado da arte do papel do glucagon na fisiopatologia da DM e suas potenciais implicações no desenvolvimento de novas terapêuticas, recorrendo à análise de publicações científicas no período de 1970 a 2016. A base de dados mais utilizada foi o PubMed.

Na seleção dos dados foram privilegiados estudos originais e artigos de revisão, sendo que o ano de publicação também foi um critério utilizado, dando preferência a publicações mais recentes. A pesquisa foi limitada a trabalhos publicados em língua inglesa ou que tivessem, pelo menos, o resumo em inglês.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. FISILOGIA DO GLUCAGON

Os níveis plasmáticos de glicose num indivíduo normal, ao longo de um dia, têm um controlo muito apertado, sendo que as suas concentrações oscilam muito pouco (valores entre 72-162 mg/dl), apesar de todas as flutuações no rácio energético (aporte/gasto) de hidratos de carbono, tais como num período pós-prandial ou após exercício físico. De modo a alcançar este controlo, com um intervalo muito restrito de concentrações-alvo, existem vários mecanismos fisiológicos, incluindo os hormonais. As principais hormonas glucorreguladoras podem ser divididas nas que rapidamente, em minutos, alteram a glicemia (insulina, glucagon e catecolaminas), e as que levam algum tempo (hormonas de crescimento, tiroideias e cortisol), cuja ação pode levar horas a surtir efeito (2).

O glucagon é uma hormona peptídica, constituída por 29 aminoácidos, hiperglicemiante, cuja produção e libertação está a cargo do pâncreas, tendo como função principal o aumento da produção hepática de glicose. Tradicionalmente, esta hormona é referida como sendo a contrarreguladora da insulina e a homeostasia normal da glicose está muito dependente do rácio na veia porta entre estas duas hormonas, insulina e glucagon, produzidas pelas células pancreáticas beta e alfa, respetivamente. Os principais processos fisiológicos envolvidos na homeostasia da glicose são a gluconeogénese, a glicogénese e a glicogenólise, processos estes que ocorrem principalmente no fígado e estão seriamente afetados na DM (3)(4).

Na célula alfa pancreática é produzida uma molécula denominada pró-glucagon, constituída por 160 aminoácidos, que, quando clivado a nível pancreático, origina o glucagon. Neste caso, o pró-glucagon é alvo de uma clivagem levada a cabo pela enzima pró-hormona convertase 2 e, como produtos da reação, obtêm-se: um fragmento maior (pró-glucagon 72-158) que é cerca de metade do pró-glucagon, um péptido pancreático relacionado com a glicentina (pró-glucagon 1-30) e o glucagon (pró-glucagon 33-61). Com a exceção do glucagon, estes fragmentos não têm qualquer atividade biológica conhecida. Por outro lado, a clivagem do pró-glucagon pode ser feita, não a nível pancreático, mas sim a nível intestinal, não originando, portanto, glucagon. Nestas condições, o pró-glucagon é, também, clivado por uma enzima, a pró-hormona convertase 1, e as moléculas obtidas são: a glicentina (pró-glucagon 1-69) – que, de seguida, é novamente clivada em péptido pancreático relacionado com a glicentina (pró-

glucagon 1-30) e oxintomodulina (pró-glucagon 33-69) – e os péptidos semelhantes ao glucagon - GLP-1 (pró-glucagon 78-107) e GLP-2 (pró-glucagon 126-158). Todo este processamento ocorre em células enteroendócrinas da mucosa intestinal, mais especificamente, nas células L. Estas células também estão presentes a nível do sistema nervoso central (5)(6).

O principal mecanismo estimulador da secreção de glucagon é a hipoglicemia, embora outras substâncias, como alguns aminoácidos e o GIP, assim como a ativação do sistema nervoso autónomo, têm, também, a capacidade de estimular as células alfa pancreáticas para a libertação de glucagon. Como moléculas inibidoras da secreção ou libertação do glucagon, merecem destaque a insulina (via ativação do recetor do GABA e a sua consequente translocação para a membrana celular (7)), a glicose, o GLP-1, a amilina (molécula secretada pelas células beta pancreáticas, em conjunto com a insulina) e a somatostatina, que é também um inibidor da secreção de insulina.

Para exercer as suas ações, o glucagon necessita de se ligar a recetores. Estes recetores são conhecidos como Gcgr, e têm duas subunidades, *Gas* e *Gaq*. Estão localizados na membrana plasmática e, como se trata de um recetor acoplado a uma proteína G, a sua ativação leva a uma amplificação de sinal e posterior regulação de fatores de transcrição em determinadas células. Quando há ativação da subunidade *Gas*, há um aumento da adenilato ciclase que acarreta um aumento da concentração de cAMP e PKA intracelulares. Por outro lado, a ativação da subunidade *Gaq*, leva a um aumento da fosfolipase C e da síntese de inositol trifosfato, cuja finalidade é a entrada de cálcio nos hepatócitos, com consequente libertação de glicose (3)(8)(9). A abolição dos recetores de glucagon leva à redução da glicemia (10). Além do fígado, outros tecidos têm este recetor, tais como, o tecido adiposo (o glucagon promove a lipólise (11)), pâncreas, trato GI, coração, cérebro e rim (onde também há gluconeogénese).

Embora não se conheça a maioria das funções dos Gcgr nestes tecidos, a sua presença indicia que o glucagon pode exercer mais funções, além das já descritas a nível da glicemia (12). Apesar dos efeitos extra-hepáticos não estarem totalmente esclarecidos, estes são evidenciados com a utilização de doses suprafisiológicas de glucagon, em certas circunstâncias. Numa emergência, o tratamento de uma hipoglicemia com glucagon pode ser tido em conta, caso haja depressão da função cardíaca (e.g. intoxicação com fármacos) e, nestes casos, as propriedades inotrópicas e cronotrópicas positivas do glucagon poderão ser úteis (13)(14).

Além disso, quando em concentrações suprafisiológicas, foi demonstrado que o glucagon diminui o apetite e o aporte de alimentos em humanos, possivelmente através da ativação de Gcgr centrais em combinação com efeitos inibitórios na motilidade GI e

no esvaziamento gástrico (15)(16). Por último, estudos de calorimetria indireta realizados em humanos demonstraram que o glucagon pode aumentar a taxa de gasto energético (17).

As concentrações em jejum de glucagon são baixas, rondando os 6-10 pmol/L. Para desempenhar o seu papel gluco regulador, as concentrações de glucagon estão dependentes das concentrações de glicose. Assim, quando há uma diminuição da glicemia para cerca de 36-54 mg/dl, a glucagonemia aumenta até 40 pmol/L, e, quando a glicemia aumenta para 180-210 mg/dl, os níveis plasmáticos de glucagon caem para 1-2 pmol/L (18). Para além da concentração de glicose, a concentração de insulina modula, também, a concentração de glucagon, sendo que, a secreção destas duas hormonas é pulsátil. Contudo, relacionam-se de forma inversa, isto é, quando uma aumenta, a outra diminui. A frequência dos pulsos de glucagon é de, aproximadamente, 5 minutos (19)(20). Esta secreção pulsátil e sua baixa concentração levam a que seja tecnicamente difícil fazer uma medição fidedigna da concentração plasmática de glucagon, sendo que esta medição se baseia na quantificação do terminal C do glucagon, já processado. Este doseamento torna-se essencial, não só por razões de investigação, como também pela possível aplicação clínica, ao nível da monitorização da terapêutica, quando o alvo é a redução da glucagonemia.

2. HIPERGLUCAGONEMIA NA DIABETES MELLITUS

Nos doentes com DM verifica-se uma perturbação do equilíbrio das duas hormonas pancreáticas principais, a insulina e o glucagon. Estes doentes têm, portanto, uma perturbação bihormonal em que a deficiência absoluta ou relativa de insulina (relacionada com a resistência periférica a esta hormona) se associa a uma hiperglucagonemia tanto em jejum como pós-prandial (21)(22)(23).

Deste modo, a “hipótese bihormonal”, proposta por Unger e Orci em 1975 (24), baseia-se no conceito de que a combinação de níveis elevados de glucagon com a deficiência relativa em insulina tem um papel central na génese da hiperglicemia diabética. O principal argumento utilizado para refutar esta teoria é que a hiperglicemia e a cetoacidose ocorrem em doentes com DM, mesmo após pancreatectomia (25). No entanto, a utilização da pancreatectomia como um modelo da DM sem glucagon é, também, controversa devido ao papel fisiológico incerto do glucagon produzido em locais extrapancreáticos (26). Todavia, com o decorrer do tempo foram realizados estudos para clarificar a secreção do glucagon, pelo que surge cada vez mais evidência que corrobora o papel da hiperglucagonemia, quer em jejum, quer no período pós-prandial, como um fator central para o desenvolvimento da hiperglicemia característica da DM (27).

A regulação da secreção do glucagon pelas células alfa do pâncreas é dotada de grande complexidade. A secreção desta hormona é controlada por uma variedade de fatores hormonais, neuronais e nutricionais, já abordados anteriormente (3). Estes fatores atuam de forma concertada na regulação da secreção de glucagon, assegurando um fornecimento adequado de energia, sem flutuações exageradas dos níveis plasmáticos de glicose. Assim, em indivíduos saudáveis, os níveis de glucagon diminuem em resposta a uma refeição com hidratos de carbono, reduzindo, desta forma, a produção hepática de glicose induzida por esta hormona. Por outro lado, doentes com DM tipo 2 apresentam níveis inapropriadamente elevados de glucagon plasmático em jejum e não são capazes de diminuir a sua concentração de forma adequada após ingestão de hidratos de carbono (28)(29). Atualmente, está bem estabelecido que a hiperglucagonemia, tanto em jejum como no período pós-prandial, aumenta o débito hepático de glicose, contribuindo, significativamente, para a hiperglicemia em jejum bem como para a hiperglicemia pós-prandial, facto que caracteriza os doentes com DM tipo 2. Com efeito, estudos indicam que a hiperglucagonemia pós-prandial poderá ser responsável por até 50% do aumento patológico da glicemia após ingestão oral de glicose em doentes com DM tipo 2 (22)(30)(31)(32).

Os mecanismos subjacentes à hiperglucagonemia nos doentes com DM tipo 2 ainda não estão totalmente esclarecidos. Foi sugerido que a célula alfa do pâncreas, em indivíduos diabéticos, adquire resistência aos efeitos supressores da secreção de glucagon, normalmente exercidos pela glicose e pela insulina (33)(34). Recentemente, foi introduzido o termo paracrinopatia para designar este fenómeno. A destruição das células beta ou a incapacidade destas em segregar insulina convenientemente em associação com insulinoresistência das células alfa são, possivelmente, os principais mecanismos pelos quais se verifica hiperglucagonemia tanto na DM tipo 1 como na DM tipo 2, respetivamente (35).

A ingestão oral de glicose é um maior estímulo da secreção de insulina que a administração intravenosa de glicose. Este fenómeno é conhecido como efeito incretina. Este efeito é explicado através da produção de hormonas pela mucosa do trato GI, estimulada por nutrientes que chegam ao tubo digestivo, que, ao alcançarem os ilhéus pancreáticos, levam ao aumento da secreção de insulina pelas células beta, de maneira dependente da glicose. Estima-se que o efeito incretina seja responsável por, aproximadamente, 50-70% da secreção total de insulina após ingestão de glicose. As principais hormonas incretinas responsáveis por este efeito são o GIP e o GLP-1 (36)(37). Estudos recentes demonstraram que a hiperglucagonemia em doentes com DM tipo 2 é agravada pela ingestão oral de glicose, mas não durante a administração intravenosa de glicose, mesmo com concentrações de glicose no plasma idênticas (isoglicemia) (38). Devido às condições isoglicémicas em que estes estudos foram efetuados, não parece provável que a disfunção das células alfa na deteção dos níveis de glicose circulante desempenhe um papel importante na resposta exagerada do glucagon após ingestão oral de glicose em doentes com DM tipo 2. O aumento da resistência à insulina ao nível das células alfa também não parece explicar a secreção aumentada de glucagon aquando da ingestão oral de glicose, dado que a resposta da insulina durante a administração oral de glicose é, devido ao efeito incretina, mais elevada quando comparada com a infusão intravenosa de glicose. Assim sendo, seria expectável uma maior supressão da secreção de glucagon aquando da ingestão oral de glicose, no entanto o que se verifica é o oposto (39). Foi provado que este fenómeno não está apenas presente em doentes com DM tipo 2, como também em indivíduos não diabéticos quando ingerem ≥ 75 g de glicose (28)(38). Globalmente, estes achados sugerem que os fatores originários da estimulação do trato GI por nutrientes desempenham um papel importante na resposta pós-prandial inadequada do glucagon na DM tipo 2, sendo que está provado que várias hormonas intestinais afetam a secreção de glucagon (40)(41)(42)(43). Outra possível explicação para estes achados

centra-se na possibilidade de que o glucagon possa ser secretado em quantidades mensuráveis pelo trato GI (44).

Do mesmo modo que as incretinas aumentam a secreção de insulina, dependente da glicose, pelas células beta, inibem, concomitantemente, a secreção de glucagon pelas células alfa. No entanto, a redução do efeito incretina é um traço característico dos doentes com DM tipo 2 (45)(46). A razão pela qual o efeito incretina está reduzido na DM tipo 2 ainda não está totalmente esclarecida, apesar de existir evidência recente que aponta para uma redução dos níveis de GLP-1 (47), assim como para uma perda de atividade do GIP (48).

Relativamente à fisiopatologia da DM tipo 2, foi sugerida a hipótese de a diminuição do rácio insulina-glucagon ter como um dos mecanismos causais o desequilíbrio do rácio de células beta e alfa, em virtude da apoptose das células beta. Contudo, foi proposto um novo mecanismo, baseado num modelo animal, que sugere que, sob stress, as células beta sofrem um processo de desdiferenciação dando origem a células progenitoras pluripotentes. Estas células podem expressar, e eventualmente secretar, glucagon e somatostatina, o que também contribui para a diminuição do rácio insulina-glucagon (49).

3. APLICAÇÃO CLÍNICA

Apesar dos recentes avanços no campo da DM e dos novos agentes hipoglicemiantes, grande parte dos doentes com DM não atingem os objetivos terapêuticos.

Algumas das manifestações da diabetes, tais como a hiperglicemia e a cetoacidose, devem-se, em grande parte, ao excesso de glucagon circulante, enquanto a deficiência em insulina ou a insulinoresistência levam a uma menor utilização de glicose (50).

Os vários estudos realizados sobre a fisiologia do glucagon e seu papel na DM, apontam para haver benefício em ter esta hormona como alvo na estratégia terapêutica da DM tipo 2, de forma a restaurar a normoglicemia (50)(51). De facto, já são usados alguns antidiabéticos eficazes que inibem a secreção de glucagon. No entanto, ainda há um longo caminho a percorrer no que toca ao desenvolvimento de novos agentes que reduzam ou bloqueiem o glucagon, sendo que esta estratégia necessita de um delicado balanço entre os seus benefícios e os seus efeitos adversos.

3.1. ANTIDIABÉTICOS COMERCIALIZADOS COM EFEITO NO GLUCAGON

Atualmente, já são comercializados vários fármacos com efeitos comprovados na célula alfa do pâncreas, apesar de não terem sido desenvolvidos com o objetivo de corrigir a hiperglucagonemia inerente à DM. Por este motivo, é compreensível que as células alfa não sejam o seu local de ação primário, pelo que a supressão do glucagon é, de certa forma, um benefício adicional destes agentes, o que pode auxiliar na compreensão e aceitação da importância terapêutica da supressão do glucagon, permitindo uma investigação mais aprofundada destes fármacos (52).

Insulina

A insulina é o agente mais eficaz na redução dos níveis plasmáticos de glicose (53) e também está provado que a infusão de insulina exógena diminui a concentração de glucagon no plasma (54). Adicionalmente, níveis elevados de insulina exógena em circulação podem levar à supressão da resposta do glucagon à hipoglicemia (55). No entanto, há a necessidade de desenvolver insulinas “inteligentes” mais gluco-reativas, com um menor risco de hipoglicemias e com um perfil que mimetize melhor o comportamento farmacocinético e farmacodinâmico da insulina endógena.

Metformina

Está bem estabelecido que a metformina inibe a produção hepática de glicose, apesar do mecanismo de ação exato através do qual este fármaco exerce todos os seus efeitos ainda não estar totalmente esclarecido (56). Em 2014, foi descoberto que a metformina, fármaco de primeira linha nas guidelines atuais (53), diminui a produção de cAMP pelos hepatócitos (57). Consequentemente, a ativação da adenilato ciclase pelo glucagon e subsequente fosforilação de proteínas envolvidas na produção de glicose está comprometida. Estes achados sugerem que a melhoria do controle glicémico exercido pela metformina deve-se, em parte, a esta inibição da sinalização do glucagon. A metformina poderá ter, também, efeitos no trato GI, levando, possivelmente, ao aumento do GLP-1, o que, indiretamente, pode levar a uma diminuição da secreção de glucagon (58)(59). Apesar de tudo, é ainda necessária mais investigação de forma a esclarecer o mecanismo de ação exato da metformina.

Sulfonilureias

As sulfonilureias ligam-se a canais de potássio sensíveis ao ATP, localizados na membrana celular das células beta, o que leva ao encerramento deste canal. Esta ligação aumenta a secreção de insulina, uma vez que torna o potencial de membrana menos negativo, o que facilita a entrada de cálcio para o meio intracelular e consequente despolarização da célula beta (60). Os estudos realizados em humanos relativamente ao seu efeito na secreção do glucagon têm mostrado resultados contraditórios, o que se deve, provavelmente, às diferentes condições experimentais, aos diferentes efeitos dos fármacos desta classe e às diferenças das populações em estudo (doentes com DM versus controlos saudáveis) (61)(62). Não obstante, não se devem desvalorizar os estudos que mostraram que as sulfonilureias inibem parcialmente a secreção de glucagon (63). Também tem sido estudada a hipótese de as sulfonilureias reduzirem a resposta do glucagon à hipoglicemia, no entanto os resultados têm sido inconclusivos (64)(65). Por este motivo, atualmente, não é possível afirmar o efeito de classe das sulfonilureias no glucagon.

Inibidores do co-transportador de sódio e glicose tipo 2 (SGLT-2)

Os inibidores do SGLT-2 são uma classe de fármacos aprovada para tratamento de adultos com DM tipo 2 em combinação com medidas não farmacológicas, dieta e exercício físico, ou outros fármacos antidiabéticos. O SGLT-2 é uma proteína membrana, localizada nos túbulos contornados proximais, que promove a reabsorção de glicose. Os inibidores do SGLT-2 ligam-se a esta proteína, inibindo a reabsorção renal de glicose (66).

Estudos recentes mostraram que doentes a realizar terapêutica com inibidores do SGLT-2 tiveram um aumento dos níveis de glucagon e da produção endógena de glicose (67)(68). O SGLT-2 é, também, expresso pelas células alfa do pâncreas, sendo que estudos *in vitro* com ilhéus de Langerhans humanos mostraram que a dapagliflozina estimula a secreção de glucagon através de canais de potássio sensíveis ao ATP (69).

Os inibidores do SGLT-2 diminuem a concentração plasmática de insulina em consequência da redução da glicemia, pelo aumento da excreção urinária de glicose (67)(68). Este achado levanta a possibilidade de que uma redução na secreção de insulina pelos ilhéus leve a um aumento da secreção de glucagon. Todavia, é necessária mais pesquisa com vista a confirmar esta hipótese. Por outro lado, um estudo recente mostrou que o aumento pós-prandial do glucagon induzido pelos inibidores da SGLT-2 se tornou menos evidente após um mês de terapêutica. Assim, há a possibilidade de este efeito não persistir a longo prazo (67).

Agonistas do péptido semelhante ao glucagon-1 (GLP-1)

Nos dias de hoje, é consensual que a eficácia da terapêutica baseada no efeito incretina se deve, em parte, à redução dos níveis de glucagon no plasma, facto observado em doentes com DM tipo 1 e 2 (70). Num estudo em que os intervenientes foram doentes com DM tipo 2 a fazer tratamento com metformina, nos que combinaram exenatide com metformina, foi verificada uma redução significativa na secreção pós-prandial de glucagon quando comparado com os valores de base (71).

O GLP-1 é um produto do pró-glucagon (70). Como mencionado anteriormente, é sintetizado, principalmente, nas células L da mucosa intestinal e apenas numa reduzida proporção nas células alfa. O recetor do GLP-1 é diferente, apesar de semelhante, do recetor do glucagon, daí haver uma atividade cruzada mínima entre estes dois ligandos e respetivos recetores. Por oposição ao glucagon, o GLP-1 regula a resposta à hiperglicemia por intermédio de vários mecanismos: aumenta a secreção de insulina,

pelas células beta, dependente da glicose e reduz o glucagon plasmático. O mecanismo pelo qual o GLP-1 reduz os níveis de glucagon no plasma ainda não está esclarecido, uma vez que a maioria dos estudos não detetaram o recetor do GLP-1 nas células alfa (72). Deste modo, explicações alternativas, tal como um controlo indireto por intermédio da somatostatina ou da regulação nervosa, foram postuladas. A administração de um antagonista do GLP-1 induz hiperglicemia e hiperglucagonemia em jejum (73)(74), pelo que estes fármacos não impediram a resposta do glucagon à hipoglicemia (75). Consoante estes estudos, o GLP-1 exerce um papel no controlo da secreção da célula alfa. Notavelmente, o tratamento com GLP-1 em doentes com DM tipo 1 mostrou-se eficaz no controlo glicémico (redução de 54 a 72 mg/dl) que é coincidente com a diminuição de 40 a 50% na concentração pós-prandial de glucagon (76)(77). Este achado indica que a supressão do glucagon é uma parte importante do efeito do GLP-1 no controlo glicémico, mesmo em diabéticos tipo 1. O primeiro ensaio clínico no qual se usou liraglutida durante uma semana evidenciou efeitos favoráveis no perfil glicémico e nas células alfa e beta de doentes com DM tipo 2, assim como uma redução significativa dos níveis plasmáticos de glucagon (78). Em suma, o tratamento baseado no GLP-1 na DM tipo 2 é uma ótima opção no contexto de disfunção dos ilhéus de Langerhans (79).

Inibidores da dipeptidil dipeptidase-4 (DPP-4)

Os inibidores da DPP-4 são fármacos administrados por via oral que prolongam a atividade do GLP-1 nativo, assim como de outros péptidos, ao inativarem a enzima que os metaboliza (DPP-4). Assim sendo, os efeitos benéficos dos inibidores da DPP-4 no controlo glicémico na DM tipo 2 foram atribuídos ao GLP-1, uma vez que estes fármacos estimulam a secreção de insulina e reduzem o glucagon plasmático de forma semelhante aos agonistas do GLP-1. Dado que as alterações no glucagon plasmático são, muitas vezes, mais pronunciadas que as alterações na insulina durante o uso crónico de inibidores da DPP-4 (80), tem-se verificado uma tendência de atribuir grande parte do efeito farmacológico destes fármacos à inibição das células alfa. Por outro lado, existem, também, estudos recentes que mostram que alguns inibidores da DPP-4 melhoram a secreção de insulina em igual magnitude à redução do glucagon plasmático (81), o que não apoia a hipótese de os inibidores da DPP-4 terem como principal alvo o glucagon. No entanto, está comprovado que a terapêutica com inibidores da DPP-4 em doentes com DM tipo 2 reduz a concentração pós-prandial de glucagon (71)(82). A vildagliptina melhora a dinâmica do glucagon em doentes com DM tipo 2, reduzindo os

níveis de glucagon durante as refeições e preservando a resposta do glucagon à hipoglicemia após 4 semanas de tratamento em doentes a realizar insulinoterapia (83). Um outro estudo, concluiu que a utilização de vildagliptina em doentes com DM tipo 2 reduziu os níveis pós-prandiais de glucagon, o que se relacionou com uma concentração de glicose plasmática mais baixa, mesmo quando os níveis de insulina não eram alterados (82).

Não obstante, a supressão do glucagon levada a cabo por estes fármacos não é tão acentuada como a observada para os agonistas do recetor do GLP-1 (71), porque os inibidores da DPP-4 potenciam a atividade do GLP-1 nativo, em doses fisiológicas, e os análogos do GLP-1 exercem os mesmos efeitos, mas em doses farmacológicas.

3.2. FÁRMACOS MODULADORES DO GLUCAGON EM INVESTIGAÇÃO

A utilização de fármacos com mecanismos de ação bem estabelecidos e conhecidos é vital para a segurança na sua prescrição por parte dos profissionais de saúde e para conseguir ganhos em saúde para as pessoas com diabetes. A dificuldade em conseguir e em manter um bom controlo glicémico sustenta a necessidade de desenvolver fármacos com novos mecanismos de ação que possam ser adicionados ou, eventualmente, substituir as terapêuticas atuais. Um dos argumentos a favor desta necessidade é o de, na maior parte dos casos, ser necessário o tratamento com múltiplos agentes para se atingir um controlo glicémico adequado. Esta abordagem incrementa a complexidade do tratamento e o risco de ocorrência de efeitos laterais que afetam a adesão terapêutica a longo prazo.

Deste modo, uma abordagem futura ao tratamento da DM passa por se desenvolverem terapêuticas dirigidas ao glucagon, inibindo a sua síntese e secreção ou recorrendo à inativação e bloqueio do seu recetor, impedindo, assim, a hiperglicemia e diminuindo a labilidade glicémica destes doentes. Atualmente, não há terapêuticas aprovadas para a DM que têm como alvo, especificamente, o glucagon ou mesmo o Gcgr, pelo que as abordagens descritas de seguida estão ainda em fase experimental.

Inibidores da síntese do recetor do glucagon - oligonucleótidos antisense

A redução da expressão do Gcgr pode melhorar as consequências da hiperglucagonemia, diminuindo a sinalização hepática mediada pelo glucagon e, consequentemente, melhorar o controlo glicémico em doentes com DM (84). Uma solução para reduzir a expressão do Gcgr é a utilização de oligonucleótidos antisense (Gcgr-ASO), reduzindo a expressão deste recetor.

A administração de um Gcgr-ASO a ratos diabéticos levou a uma redução na concentração plasmática de glicose, redução dos níveis plasmáticos e hepáticos de triglicerídeos, assim como de ácidos gordos livres, e a uma melhor tolerância à glicose (85)(86). Não foram relatados episódios de hipoglicemia, todavia a diminuição da expressão do Gcgr associou-se a um aumento marcado dos níveis de glucagon plasmático (85). Este aumento do glucagon foi acompanhado por hipertrofia e hiperplasia das células alfa (86). É importante salientar que, para além da diminuição da expressão de genes regulados pelo cAMP no fígado e da diminuição da produção hepática de glicose induzida pelo glucagon, a inibição dos Gcgr associou-se ao aumento da concentração plasmática de GLP-1 e de insulina nos ilhéus de Langerhans (86). Além

disto, ratos sem Gcgr exibiram uma sensibilidade aumentada a lesão hepática induzida experimentalmente, o que implica que o Gcgr é importante para a viabilidade dos hepatócitos (87).

O Isis-GCGR Rx (ISIS-325568) é um exemplo deste tipo de fármacos. Num ensaio clínico em fase 2, este fármaco foi administrado por via endovenosa, uma vez por semana, durante 13 semanas, a doentes com falência da terapêutica com metformina. A redução média do valor da HbA1c no final do estudo, em comparação com a medição inicial, foi superior a 1% no grupo que realizou uma dose de 100 mg e superior a 2% no grupo que efetuou uma dose de 200 mg (84).

Inibidores da secreção do glucagon

Um estudo em ratos transgênicos com ablação do fator de transcrição Arx (aristaless-related homeobox) das células alfa, resultou na perda completa das células alfa pancreáticas produtoras de glucagon. A utilização destes ratos sem células alfa, que se mostraram saudáveis, demonstrou níveis inferiores de glicose plasmática, após 24 horas de jejum, em comparação com o grupo de controlo. Os ratos em questão apresentaram, também, melhor tolerância à glicose, níveis indetetáveis de glucagon plasmático e menor produção hepática de glicose. Posteriormente, procedeu-se à administração de estreptozocina, que destrói as células beta, nos ratos sem Arx e constatou-se que estes não desenvolveram a hiperglicemia significativa observada nos ratos controlo após também terem sido tratados com estreptozocina (88).

Foi descoberto que a ranolazina, um antianginoso, inibe a secreção de glucagon tanto *in vitro* como *in vivo*. Este fármaco bloqueia um canal de sódio dependente da voltagem nas células dos ilhéus pancreáticos inibindo, desta forma, a secreção de glucagon. Em modelos animais com diabetes, o tratamento com ranolazina associou-se à redução dos níveis de glucagon basais e pós-prandiais e à diminuição da hiperglicemia (89). Num ensaio clínico em que doentes com DM tipo 2 realizaram ranolazina em monoterapia, foi constatada uma redução da HbA1c de, aproximadamente, 0,56%, em comparação com o placebo, bem como da concentração plasmática de glicose tanto em jejum como no período pós-prandial (90).

Estes achados realçam a primordial importância das células alfa e do glucagon no metabolismo da glicose e as potenciais vantagens da supressão ou bloqueio da secreção desta hormona no tratamento da DM tipo 2.

Anticorpos monoclonais

Uma possibilidade para estudar os efeitos do déficit seletivo de glucagon é a utilização de anticorpos monoclonais dirigidos contra esta mesma hormona ou o seu recetor (91)(92). A aplicabilidade destes fármacos foi confirmada em ratos não diabéticos pela demonstração de que anticorpos monoclonais de alta afinidade para o glucagon têm a capacidade de abolir completamente o efeito hiperglicemiante da administração de glucagon exógeno. Em ratos diabéticos tratados com estreptozocina, os anticorpos anti-glucagon anularam a elevação, que de outro modo seria proeminente, da glicose plasmática pós-prandial (91). Um outro estudo realizado em ratos diabéticos demonstrou que o tratamento com anticorpos monoclonais anti-glucagon reduz, significativamente, a concentração plasmática de glucagon e triglicerídeos, melhora a tolerância à glicose, reduz a HbA1c e a produção hepática de glicose (93).

Da mesma forma, em coelhos com uma quantidade reduzida ou mesmo inexistente de células beta, devido ao tratamento com aloxano (análogo tóxico da glicose com seletividade para as células beta), os anticorpos monoclonais anti-glucagon normalizaram os níveis de glicose em jejum. Curiosamente, a partir de estudos que recorrem a técnicas de “clamp”, estima-se que a hiperglucagonemia, nos coelhos, possa contribuir para metade do aumento da produção hepática de glicose (92).

Foi desenvolvido o REGN1193, um anticorpo monoclonal humano que se liga ao Gcgr, bloqueando-o. Um estudo recente, em que este fármaco foi administrado a ratos e macacos diabéticos, concluiu que este tem a capacidade de normalizar os níveis plasmáticos de glicose em jejum sem causar hipoglicemia e melhora a tolerância à glicose, apesar de estar associado a um aumento da concentração plasmática de glucagon e GLP-1 (94). O REGN1193 está a ser utilizado em ensaios clínicos, que ainda se encontram em fase 1, em doentes com DM tipo 2 (95).

Antagonistas dos recetores do glucagon

O rácio elevado glucagon/insulina e a incapacidade de suprimir a secreção pós-prandial de glucagon são fatores importantes que determinam, respetivamente, a hiperglicemia em jejum e pós-prandial nos doentes com DM tipo 2 (96). Por estas razões, desde os anos 90, o Gcgr é tido com um potencial alvo para o tratamento da DM tipo 2. Estudos realizados em ratos sem o Gcgr demonstraram que estes animais são capazes de manter níveis plasmáticos de glicose e lípidos normais, apesar de concentrações plasmáticas bastante elevadas de glucagon e níveis plasmáticos de

insulina normais (97). Além disto, apresentaram, também, hiperplasia das células alfa e aumento da concentração de GLP-1 (10).

O primeiro antagonista dos Gcgr a ser desenvolvido denominou-se BAY 27-9955 (Bayer) e foi utilizado num ensaio clínico fase 1, controlado por placebo. Os 14 participantes eram saudáveis e do sexo masculino, sendo que foi efetuada uma infusão de somatostatina (de forma a suprimir a produção endógena de glucagon e insulina), seguida de uma infusão de insulina (até uma concentração basal) e de glucagon (até se atingir um estado de hiperglucagonemia) (98). No grupo controlo, durante o período hiperglucagonémico, verificou-se um aumento de 75% da concentração plasmática de glicose e a produção hepática de glicose duplicou. No grupo que realizou o fármaco em estudo os efeitos mediados pelo glucagon exógeno foram bastante menos evidentes, sendo que o composto foi bem tolerado. Todavia, o desenvolvimento deste fármaco foi descontinuado.

O MK-0893 (Merck) é outro fármaco desta classe em investigação. Foi realizado um ensaio clínico em fase 2 no qual se observou que este fármaco reduziu significativamente a HbA1c (0,6 a 1,5%) e a concentração plasmática de glicose em jejum (99). Um outro estudo mostrou que a combinação de MK-0893 e metformina é mais eficaz na redução dos níveis médios de glicose ao longo de 24 horas do que a combinação de sitagliptina e metformina (100). No entanto, verificou-se um aumento das transaminases hepáticas, colesterol total e colesterol LDL nos doentes que realizaram MK-0893 (99)(100). Por outro lado, quando o MK-0893 foi utilizado em combinação com metformina verificou-se, curiosamente, uma redução nestes parâmetros do perfil lipídico (100).

O MK-3577 (Merck) é um antagonista dos Gcgr com uma semi-vida mais curta em comparação com o MK-0893. Estudos em fase 2 concluíram que há uma relação entre o controlo glicémico e os níveis de colesterol LDL. Um bloqueio completo dos Gcgr melhora o controlo glicémico, mas também aumenta o colesterol LDL, enquanto um bloqueio parcial dos Gcgr tem efeitos menores no controlo glicémico e nos níveis de colesterol LDL (101).

Outro fármaco de interesse pertencente a esta classe é o LY-2409021, que é um antagonista dos Gcgr administrado por via oral. Foi efetuado um ensaio clínico fase 2 que avaliou os efeitos de 28 dias de terapêutica com LY-2409021. Os resultados mostraram uma redução significativa dos níveis plasmáticos de glicose em jejum e no período pós-prandial, enquanto os níveis de glucagon e GLP-1 em jejum aumentaram. Ao 28º dia, observou-se, também, uma redução estatisticamente significativa da HbA1c (0,7 a 1% com LY-2409021 em comparação com 0,5% com metformina). O fármaco foi bem tolerado e o risco de hipoglicemia foi mínimo. Por outro lado, verificaram-se

elevações reversíveis, assintomáticas e dose-dependentes das transaminases hepáticas (102). Em suma, a inibição da sinalização do glucagon utilizando o LY-2109021 é uma terapêutica promissora para os doentes com DM tipo 2 e deve permanecer em ensaios clínicos de maior duração, para que seja possível avaliar melhor os seus riscos e benefícios (102).

Apesar dos antagonistas dos Gcgr se terem demonstrado eficazes na melhoria do controlo glicémico em doentes com DM tipo 2, o bloqueio dos Gcgr tem algumas limitações, nomeadamente, a falta de dados sobre o perfil de segurança a longo prazo em humanos, a hiperplasia das células alfa, o aumento das transaminases hepáticas e o aumento do colesterol total e LDL. Visto que o glucagon é dotado de efeitos hipolipemiantes, o bloqueio dos Gcgr poderá estar associado a hiperlipidemia e, eventualmente, a esteatose hepática. O aumento do colesterol observado poderá estar associado à estimulação da oxidação dos ácidos gordos levada a cabo pelo glucagon, pelo que o antagonismo dos Gcgr contraria este efeito.

CONCLUSÕES

O tratamento da DM é complexo, havendo, na maior parte dos casos, a necessidade de se utilizar múltiplos fármacos, o que aumenta o risco de ocorrência de efeitos adversos. Além disso, a dificuldade em atingir e manter um controlo glicémico adequado sustenta a necessidade de desenvolver novos compostos com mecanismos de ação inovadores.

A desregulação do glucagon contribui substancialmente para a fisiopatologia da DM tipo 2. Deste modo, a utilização de fármacos antidiabéticos com ação nesta hormona poderá auxiliar na otimização do controlo glicémico nas pessoas com diabetes. Este é um tema de interesse crescente na comunidade científica, contudo, atualmente, não há terapêuticas aprovadas para a DM que tenham como alvo primário o glucagon ou o seu recetor. Algumas das classes de fármacos utilizadas hoje em dia no tratamento da DM exercem parte do seu efeito antidiabético devido à influência que têm na secreção desta hormona, diminuindo-a, dos quais se destacam as terapêuticas baseadas nas incretinas.

Estão em desenvolvimento fármacos moduladores do glucagon que mostraram resultados promissores em estudos de fase pré-clínica e que, atualmente, estão a ser estudados em ensaios clínicos em fase precoce. Estes agentes incluem inibidores da síntese do Gcgr, que diminuem a expressão deste recetor, anticorpos monoclonais, dirigidos ao glucagon ou ao seu recetor, e antagonistas dos Gcgr. Apesar dos benefícios que demonstraram no controlo glicémico, é necessária mais investigação sobre o perfil de segurança destes fármacos em humanos, nomeadamente, no respeitante à elevação do colesterol e enzimas hepáticas verificada com a utilização de alguns antagonistas dos Gcgr. Apesar da maioria dos estudos efetuados ser em diabéticos tipo 2, a aplicabilidade destas terapêuticas trará benefícios tanto para os diabéticos tipo 1 como para os diabéticos tipo 2, uma vez que, em ambos, se verificou uma disfunção do glucagon.

Classicamente, o tratamento da DM baseia-se na utilização de fármacos com efeitos insulíntrópicos, todavia, nos dias de hoje, o foco de investigação são fármacos com efeitos glucagonostáticos, com vista a complementar a terapêutica vigente. Esta mudança de paradigma trará potenciais ganhos em saúde para os doentes diabéticos.

Em suma, a perspetiva futura em relação à otimização do tratamento da DM beneficiará de um balanço entre o controlo da disfunção das células alfa e a terapêutica promotora da ação, secreção ou substituição da insulina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Global Report on Diabetes. 2016;88. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf
2. Gerich JE. Physiology of glucose homeostasis. *Diabetes Obes Metab*. 2000 Dec;2(6):345–50.
3. Gromada J, Franklin I, Wollheim CB. Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev*. 2007 Feb;28(1):84–116.
4. Unger RH, Orci L. Glucagon and the A cell: physiology and pathophysiology (first two parts). *N Engl J Med*. 1981 Jun 18;304(25):1518–24.
5. Holst JJ. Glucagon and glucagon-like peptides 1 and 2. *Results Probl Cell Differ*. 2010;50:121–35.
6. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 2007 May;132(6):2131–57.
7. Xu E, Kumar M, Zhang Y, Ju W, Obata T, Zhang N, et al. Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABAA receptor system. *Cell Metab*. 2006 Jan;3(1):47–58.
8. Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Apr;284(4):E671–8.
9. Yamatani K, Saito K, Ikezawa Y, Ohnuma H, Sugiyama K, Manaka H, et al. Relative contribution of Ca²⁺-dependent mechanism in glucagon-induced glucose output from the liver. *Arch Biochem Biophys*. 1998 Jul 15;355(2):175–80.
10. Gelling RW, Du XQ, Dichmann DS, Romer J, Huang H, Cui L, et al. Lower blood glucose, hyperglucagonemia, and pancreatic alpha cell hyperplasia in glucagon receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb 4;100(3):1438–43.
11. McGarry JD, Foster DW. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem*. 1980;49:395–420.
12. Hansen LH, Abrahamsen N, Nishimura E. Glucagon receptor mRNA distribution in rat tissues. *Peptides*. 1995;16(6):1163–6.
13. White CM. A review of potential cardiovascular uses of intravenous glucagon administration. *J Clin Pharmacol*. 1999 May;39(5):442–7.
14. Bailey B. Glucagon in beta-blocker and calcium channel blocker overdoses: a systematic review. *J Toxicol Clin Toxicol*. 2003;41(5):595–602.
15. PENICK SB, HINKLE LE. Depression of food intake induced in healthy subjects by glucagon. *N Engl J Med*. 1961 May 4;264:893–7.
16. Geary N, Kissileff HR, Pi-Sunyer FX, Hinton V. Individual, but not simultaneous,

- glucagon and cholecystokinin infusions inhibit feeding in men. *Am J Physiol.* 1992 Jun;262(6 Pt 2):R975–80.
17. Calles-Escandón J. Insulin dissociates hepatic glucose cycling and glucagon-induced thermogenesis in man. *Metabolism.* 1994 Aug;43(8):1000–5.
 18. Christensen M, Vedtofte L, Holst JJ, Vilsbøll T, Knop FK. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide: a bifunctional glucose-dependent regulator of glucagon and insulin secretion in humans. *Diabetes.* 2011 Dec;60(12):3103–9.
 19. Pørksen N, Munn S, Steers J, Veldhuis JD, Butler PC. Impact of sampling technique on appraisal of pulsatile insulin secretion by deconvolution and cluster analysis. *Am J Physiol.* 1995 Dec;269(6 Pt 1):E1106–14.
 20. Menge BA, Grüber L, Jørgensen SM, Deacon CF, Schmidt WE, Veldhuis JD, et al. Loss of inverse relationship between pulsatile insulin and glucagon secretion in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2011 Aug;60(8):2160–8.
 21. Unger RH. Glucagon Physiology and Pathophysiology. *N Engl J Med.* 1971 Aug 19;285(8):443–9.
 22. Reaven GM, Chen YD, Golay A, Swislocki AL, Jaspan JB. Documentation of hyperglucagonemia throughout the day in nonobese and obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987 Jan;64(1):106–10.
 23. Baron AD, Schaeffer L, Shragg P, Kolterman OG. Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics. *Diabetes.* 1987 Mar;36(3):274–83.
 24. Unger RH, Orci L. The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Lancet (London, England).* 1975 Jan 4;1(7897):14–6.
 25. Barnes AJ, Bloom SR, Goerge K, Alberti GM, Smythe P, Alford FP, et al. Ketoacidosis in pancreatectomized man. *N Engl J Med.* 1977 Jun 2;296(22):1250–3.
 26. Knop F, Hare K, Pedersen J, Hendel J, Holst J, Vilsbøll T. Prohormone convertase 2 positive enteroendocrine cells are more abundant in patients with type 2 diabetes - a potential source of gut-derived glucagon. *EASD, 47th Annual Meeting*, 2011.
 27. Dunning BE, Gerich JE. The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr Rev.* 2007 May;28(3):253–83.
 28. Bagger JI, Knop FK, Lund A, Holst JJ, Vilsbøll T. Glucagon responses to increasing oral loads of glucose and corresponding isoglycaemic intravenous glucose infusions in patients with type 2 diabetes and healthy individuals.

- Diabetologia. 2014 Aug;57(8):1720–5.
29. Knop FK, Aaboe K, Vilsbøll T, Vølund A, Holst JJ, Krarup T, et al. Impaired incretin effect and fasting hyperglucagonaemia characterizing type 2 diabetic subjects are early signs of dysmetabolism in obesity. *Diabetes Obes Metab*. 2012 Jun;14(6):500–10.
 30. Kawamori D, Kurpad AJ, Hu J, Liew CW, Shih JL, Ford EL, et al. Insulin signaling in alpha cells modulates glucagon secretion in vivo. *Cell Metab*. 2009 Apr;9(4):350–61.
 31. Dinneen S, Alzaid A, Turk D, Rizza R. Failure of glucagon suppression contributes to postprandial hyperglycaemia in IDDM. *Diabetologia*. 1995 Mar;38(3):337–43.
 32. Shah P, Vella A, Basu A, Basu R, Schwenk WF, Rizza RA. Lack of suppression of glucagon contributes to postprandial hyperglycemia in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Nov;85(11):4053–9.
 33. Dunning BE, Foley JE, Ahrén B. Alpha cell function in health and disease: influence of glucagon-like peptide-1. *Diabetologia*. 2005 Sep;48(9):1700–13.
 34. Borghi VC, Wajchenberg BL, Cesar FP. Plasma glucagon suppressibility after oral glucose in obese subjects with normal and impaired glucose tolerance. *Metabolism*. 1984 Dec;33(12):1068–74.
 35. Unger RH, Orci L. Paracrinology of islets and the paracrinopathy of diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 14;107(37):16009–12.
 36. Kazafeos K. Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 Aug;93 Suppl 1:S32–6.
 37. Ahrén B. Incretin dysfunction in type 2 diabetes: clinical impact and future perspectives. *Diabetes Metab*. 2013 May;39(3):195–201.
 38. Meier JJ, Deacon CF, Schmidt WE, Holst JJ, Nauck MA. Suppression of glucagon secretion is lower after oral glucose administration than during intravenous glucose administration in human subjects. *Diabetologia*. 2007 Apr;50(4):806–13.
 39. Meier JJ. The contribution of incretin hormones to the pathogenesis of type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009 Aug;23(4):433–41.
 40. Santeusano F, Faloon GR, Unger RH. Suppressive effect of secretin upon pancreatic alpha cell function. *J Clin Invest*. 1972 Jul;51(7):1743–9.
 41. Nauck MA, Weber I, Bach I, Richter S, Orskov C, Holst JJ, et al. Normalization of fasting glycaemia by intravenous GLP-1 ([7-36 amide] or [7-37]) in type 2 diabetic patients. *Diabet Med*. 1998 Nov;15(11):937–45.
 42. Chia CW, Carlson OD, Kim W, Shin Y-K, Charles CP, Kim HS, et al. Exogenous glucose-dependent insulinotropic polypeptide worsens post prandial hyperglycemia in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2009 Jun;58(6):1342–9.

43. Hare KJ, Vilsbøll T, Holst JJ, Knop FK. Inappropriate glucagon response after oral compared with isoglycemic intravenous glucose administration in patients with type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010 Apr;298(4):E832–7.
44. Holst JJ, Christensen M, Lund A, de Heer J, Svendsen B, Kielgast U, et al. Regulation of glucagon secretion by incretins. *Diabetes Obes Metab*. 2011 Oct;13 Suppl 1:89–94.
45. Bagger JI, Knop FK, Lund A, Vestergaard H, Holst JJ, Vilsbøll T. Impaired regulation of the incretin effect in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Mar;96(3):737–45.
46. Woerle HJ, Carneiro L, Derani A, Göke B, Schirra J. The role of endogenous incretin secretion as amplifier of glucose-stimulated insulin secretion in healthy subjects and patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2012 Sep;61(9):2349–58.
47. Færch K, Torekov SS, Vistisen D, Johansen NB, Witte DR, Jonsson A, et al. GLP-1 Response to Oral Glucose Is Reduced in Prediabetes, Screen-Detected Type 2 Diabetes, and Obesity and Influenced by Sex: The ADDITION-PRO Study. *Diabetes*. 2015 Jul;64(7):2513–25.
48. Knop FK, Vilsbøll T, Højberg P V, Larsen S, Madsbad S, Vølund A, et al. Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes*. 2007 Aug;56(8):1951–9.
49. Dor Y, Glaser B. β -cell dedifferentiation and type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2013 Feb 7;368(6):572–3.
50. Zhang BB, Moller DE. New approaches in the treatment of type 2 diabetes. *Curr Opin Chem Biol*. 2000 Aug;4(4):461–7.
51. Unger RH, Cherrington AD. Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *J Clin Invest*. 2012 Jan 3;122(1):4–12.
52. Egan AG, Blind E, Dunder K, de Graeff PA, Hummer BT, Bourcier T, et al. Pancreatic safety of incretin-based drugs--FDA and EMA assessment. *N Engl J Med*. 2014 Feb 27;370(9):794–7.
53. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes - 2016. *Diabetes Care*. 2016;39 (Supplement 1). Disponível em: http://care.diabetesjournals.org/content/suppl/2015/12/21/39.Supplement_1.DC2/2016-Standards-of-Care.pdf
54. Raskin P, Fujita Y, Unger RH. Effect of insulin-glucose infusions on plasma glucagon levels in fasting diabetics and nondiabetics. *J Clin Invest*. 1975 Nov;56(5):1132–8.
55. Liu DT, Adamson UC, Lins PE, Kollind ME, Moberg EA, Andréasson K. Inhibitory

- effect of circulating insulin on glucagon secretion during hypoglycemia in type I diabetic patients. *Diabetes Care*. 1992 Jan;15(1):59–65.
56. Rena G, Pearson ER, Sakamoto K. Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia*. 2013 Sep;56(9):1898–906.
 57. Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature*. 2013 Feb 14;494(7436):256–60.
 58. Napolitano A, Miller S, Nicholls AW, Baker D, Van Horn S, Thomas E, et al. Novel gut-based pharmacology of metformin in patients with type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*. 2014;9(7):e100778.
 59. Buse JB, DeFronzo RA, Rosenstock J, Kim T, Burns C, Skare S, et al. The Primary Glucose-Lowering Effect of Metformin Resides in the Gut, Not the Circulation: Results From Short-term Pharmacokinetic and 12-Week Dose-Ranging Studies. *Diabetes Care*. 2016 Feb;39(2):198–205.
 60. Proks P, Reimann F, Green N, Gribble F, Ashcroft F. Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes*. 2002 Dec;51 Suppl 3:S368–76.
 61. Pek S, Fajans SS, Floyd JC, Knopf RF, Conn JW. Failure of sulfonylureas to suppress plasma glucagon in man. *Diabetes*. 1972 Apr;21(4):216–23.
 62. Tsalikian E, Dunphy TW, Bohannon N V, Lorenzi M, Gerich JE, Forsham PH, et al. The effect of chronic oral antidiabetic therapy on insulin and glucagon responses to a meal. *Diabetes*. 1977 Apr;26(4):314–21.
 63. Pfeifer MA, Halter JB, Judzewitsch RG, Beard JC, Best JD, Ward WK, et al. Acute and chronic effects of sulfonylurea drugs on pancreatic islet function in man. *Diabetes Care*. 1984;7 Suppl 1:25–34.
 64. Landstedt-Hallin L, Adamson U, Lins PE. Oral glibenclamide suppresses glucagon secretion during insulin-induced hypoglycemia in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Sep;84(9):3140–5.
 65. ter Braak EWMT, Appelman AMMF, van der Tweel I, Erkelens DW, van Haeften TW. The sulfonylurea glyburide induces impairment of glucagon and growth hormone responses during mild insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes Care*. 2002 Jan;25(1):107–12.
 66. Monica Reddy RP, Inzucchi SE. SGLT2 inhibitors in the management of type 2 diabetes. *Endocrine*. 2016 Jun 7.
 67. Ferrannini E, Muscelli E, Frascerra S, Baldi S, Mari A, Heise T, et al. Metabolic response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in type 2 diabetic patients. *J Clin Invest*. 2014 Feb;124(2):499–508.
 68. Merovci A, Solis-Herrera C, Daniele G, Eldor R, Fiorentino TV, Tripathy D, et al.

- Dapagliflozin improves muscle insulin sensitivity but enhances endogenous glucose production. *J Clin Invest*. 2014 Feb;124(2):509–14.
69. Bonner C, Kerr-Conte J, Gmyr V, Queniat G, Moerman E, Thévenet J, et al. Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nat Med*. 2015 May;21(5):512–7.
70. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab*. 2006 Mar;3(3):153–65.
71. DeFronzo RA, Okerson T, Viswanathan P, Guan X, Holcombe JH, MacConell L. Effects of exenatide versus sitagliptin on postprandial glucose, insulin and glucagon secretion, gastric emptying, and caloric intake: a randomized, cross-over study. *Curr Med Res Opin*. 2008 Oct;24(10):2943–52.
72. Gromada J, Rorsman P. New insights into the regulation of glucagon secretion by glucagon-like peptide-1. *Horm Metab Res*. 2004;36(11-12):822–9.
73. D'Alessio DA, Vogel R, Prigeon R, Laschansky E, Koerker D, Eng J, et al. Elimination of the action of glucagon-like peptide 1 causes an impairment of glucose tolerance after nutrient ingestion by healthy baboons. *J Clin Invest*. 1996 Jan 1;97(1):133–8.
74. Schirra J, Sturm K, Leicht P, Arnold R, Göke B, Katschinski M. Exendin(9-39)amide is an antagonist of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in humans. *J Clin Invest*. 1998 Apr 1;101(7):1421–30.
75. Hompesch M, Jones-Leone A, Carr MC, Matthews J, Zhi H, Young M, et al. Albiglutide does not impair the counter-regulatory hormone response to hypoglycaemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, stepped glucose clamp study in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab*. 2015 Jan;17(1):82–90.
76. Creutzfeldt WO, Kleine N, Willms B, Orskov C, Holst JJ, Nauck MA. Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I(7-36) amide in type I diabetic patients. *Diabetes Care* []. 1996 Jun;19(6):580–6.
77. Kielgast U, Krarup T, Holst JJ, Madsbad S. Four weeks of treatment with liraglutide reduces insulin dose without loss of glycemic control in type 1 diabetic patients with and without residual beta-cell function. *Diabetes Care*. 2011 Jul;34(7):1463–8.
78. Degn KB, Juhl CB, Sturis J, Jakobsen G, Brock B, Chandramouli V, et al. One week's treatment with the long-acting glucagon-like peptide 1 derivative liraglutide (NN2211) markedly improves 24-h glycemia and alpha- and beta-cell function and reduces endogenous glucose release in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004 May;53(5):1187–94.

79. Meier JJ. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2012 Dec;8(12):728–42.
80. Cryer PE. Minireview: Glucagon in the pathogenesis of hypoglycemia and hyperglycemia in diabetes. *Endocrinology*. 2012 Mar;153(3):1039–48.
81. Bagger JI, Knop FK, Holst JJ, Vilsbøll T. Glucagon antagonism as a potential therapeutic target in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* []. 2011 Nov;13(11):965–71.
82. Åhrén B, Landin-Olsson M, Jansson P-A, Svensson M, Holmes D, Schweizer A. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 May;89(5):2078–84.
83. Farngren J, Persson M, Schweizer A, Foley JE, Åhrén B. Glucagon dynamics during hypoglycaemia and food-re-challenge following treatment with vildagliptin in insulin-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2014 Sep;16(9):812–8.
84. ISIS Pharmaceuticals. Press release dated 16th June, 2014. Disponível em: <http://ir.ionispharma.com/phoenix.zhtml?c=222170&p=irol-newsArticle&ID=1939938>.
85. Liang Y, Osborne MC, Monia BP, Bhanot S, Gaarde WA, Reed C, et al. Reduction in glucagon receptor expression by an antisense oligonucleotide ameliorates diabetic syndrome in db/db mice. *Diabetes*. 2004 Feb;53(2):410–7.
86. Sloop KW, Cao JX-C, Siesky AM, Zhang HY, Bodenmiller DM, Cox AL, et al. Hepatic and glucagon-like peptide-1-mediated reversal of diabetes by glucagon receptor antisense oligonucleotide inhibitors. *J Clin Invest*. 2004 Jun;113(11):1571–81.
87. Ali S, Drucker DJ. Benefits and limitations of reducing glucagon action for the treatment of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Mar;296(3):E415–21.
88. Hancock AS, Du A, Liu J, Miller M, May CL. Glucagon deficiency reduces hepatic glucose production and improves glucose tolerance in adult mice. *Mol Endocrinol*. 2010 Aug;24(8):1605–14.
89. Dhalla AK, Yang M, Ning Y, Kahlig KM, Krause M, Rajamani S, et al. Blockade of Na⁺ channels in pancreatic α -cells has antidiabetic effects. *Diabetes*. 2014 Oct;63(10):3545–56.
90. Eckel RH, Henry RR, Yue P, Dhalla A, Wong P, Jochelson P, et al. Effect of Ranolazine Monotherapy on Glycemic Control in Subjects With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2015 Jul;38(7):1189–96.

91. Brand CL, Rolin B, Jørgensen PN, Svendsen I, Kristensen JS, Holst JJ. Immunoneutralization of endogenous glucagon with monoclonal glucagon antibody normalizes hyperglycaemia in moderately streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*. 1994 Oct;37(10):985–93.
92. Brand CL, Jørgensen PN, Svendsen I, Holst JJ. Evidence for a major role for glucagon in regulation of plasma glucose in conscious, nondiabetic, and alloxan-induced diabetic rabbits. *Diabetes*. 1996 Aug;45(8):1076–83.
93. Sørensen H, Brand CL, Neschen S, Holst JJ, Fosgerau K, Nishimura E, et al. Immunoneutralization of endogenous glucagon reduces hepatic glucose output and improves long-term glycemic control in diabetic ob/ob mice. *Diabetes*. 2006 Oct;55(10):2843–8.
94. Okamoto H, Kim J, Aglione J, Lee J, Cavino K, Na E, et al. Glucagon Receptor Blockade With a Human Antibody Normalizes Blood Glucose in Diabetic Mice and Monkeys. *Endocrinology*. 2015 Aug;156(8):2781–94.
95. Study of REGN1193 in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02284425>.
96. D'Alessio D. The role of dysregulated glucagon secretion in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2011 Oct;13 Suppl 1:126–32.
97. Parker JC, Andrews KM, Allen MR, Stock JL, McNeish JD. Glycemic control in mice with targeted disruption of the glucagon receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jan 18;290(2):839–43.
98. Petersen KF, Sullivan JT. Effects of a novel glucagon receptor antagonist (Bay 27-9955) on glucagon-stimulated glucose production in humans. *Diabetologia*. 2001 Nov;44(11):2018–24.
99. Engel S, Xu L, Andryuk P, Davies M, Amatruda J, Kaufman K et al. Efficacy and tolerability of MK-0893, a glucagon receptor antagonist (GR A), in patients with type 2 diabetes (T2DM). American Diabetes Association 71st Scientific Sessions, 24-28 June 2011, San Diego, California. Presentation 309.
100. Engel S, Teng R, Edwards R, Davies M, Kaufman K, Goldstein B. Efficacy and safety of the glucagon receptor antagonist, MK-0893, in combination with metformin or sitagliptin in patients with type 2 diabetes mellitus. 47th EASD Annual Meeting, Lisbon, Portugal 12-16 September 2011. Presentation Number 191. Disponível em: <http://www.easdvirtualmeeting.org/resources/efficacy-and-safety-of-the-glucagon-receptor-antagonist-mk-0893-in-combination-with-metformin-or-sitagliptin-in-patients-with-type-2-diabetes-mellitus>.
101. DeFronzo RA, Triplitt CL, Abdul-Ghani M, Cersosimo E. Novel Agents for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Diabetes Spectr*. 2014 May;27(2):100–12.

102. Kelly RP, Garhyan P, Raddad E, Fu H, Lim CN, Prince MJ, et al. Short-term administration of the glucagon receptor antagonist LY2409021 lowers blood glucose in healthy people and in those with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2015 Apr;17(4):414–22.